Le micosi da miceti filamentosi

Dr.ssa Lo Cascio Giuliana

DERMATOFITOSI (=Tigne = Ringworm)

- Infezioni della cute e annessi (peli, capelli, unghia) causate da un gruppo di funghi cheratinofili chiamati dermatofiti.
  - *Microsporum* Peli. cute
  - *Epidermophyton* Cute, unghia
  - *Trichophyton* Peli, cute, unghia

DERMATOFITI

- Digeriscono la cheratina grazie alle cheratinasi
- Resistono alla cicloeximide
- Classificati in tre gruppi in relazione al loro habitat usuale

DERMATOFITI

- ANTROPOFILI

Trichophyton rubrum, Epidermophyton floccosum…

- GEOFILI

Microsporum gypseum…

- ZOOFILI

Microsporum canis: gatti e cani

Microsporum nanum: maiali *Trichophyton verrucosum:* cavalli e maiali…

DERMATOFITOSI
Patogenesi e immunità

- Contatto e trauma
- Umidità
- Condizioni di affollamento
- Immunodeficienza cellulare →(inf. croniche)
- Re-infezioni possibili (necessario un inoculo abbondante e il decorso è più breve)

DERMATOFITOSI
Classificazione clinica

- Il quadro clinico è indicato dal sito anatomico coinvolto

a. Tinea barbae
b. Tinea corporis
c. Tinea capitis
d. Tinea cruris
e. Tinea pedis (piede d'Atleta)
f. Tinea manuum
g. Tinea unguium

Tinea corporis

Tinea corporis

Tinea capitis

Tinea corporis

Tinea barbae

Tinea facies

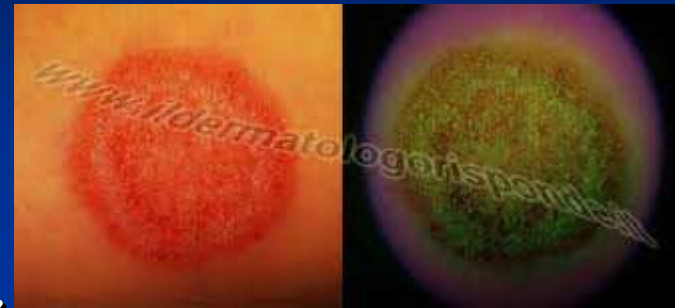
DERMATOFITOSI
Trasmissione

- Contatti umani stretti
- Scambio di abiti, pettini, spazzole, asciugamani, lenzuola,... (Indiretta)
- Contatto animale-uomo (Zoofila)

DERMATOFITOSI
Diagnosi

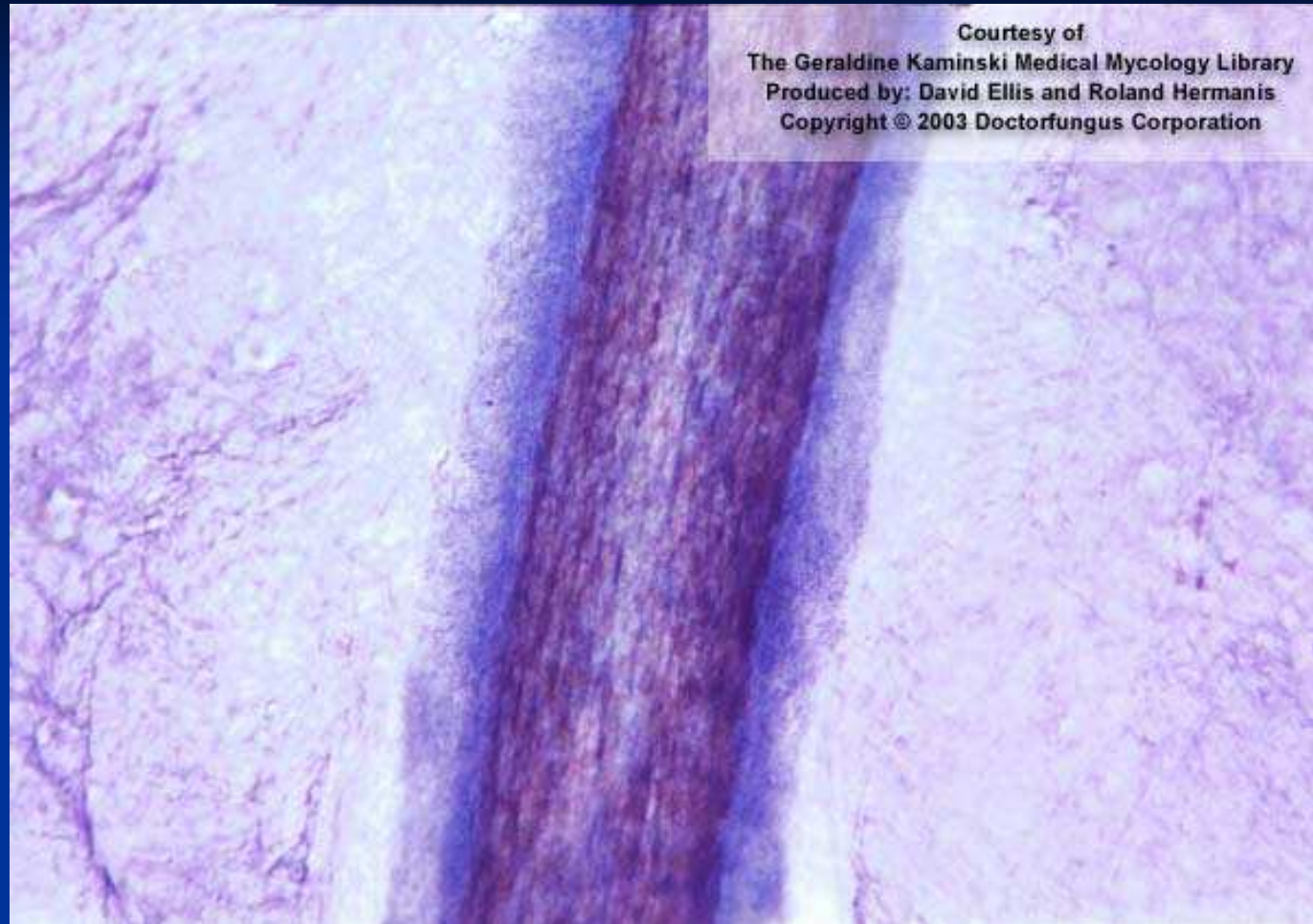
I. Clinica

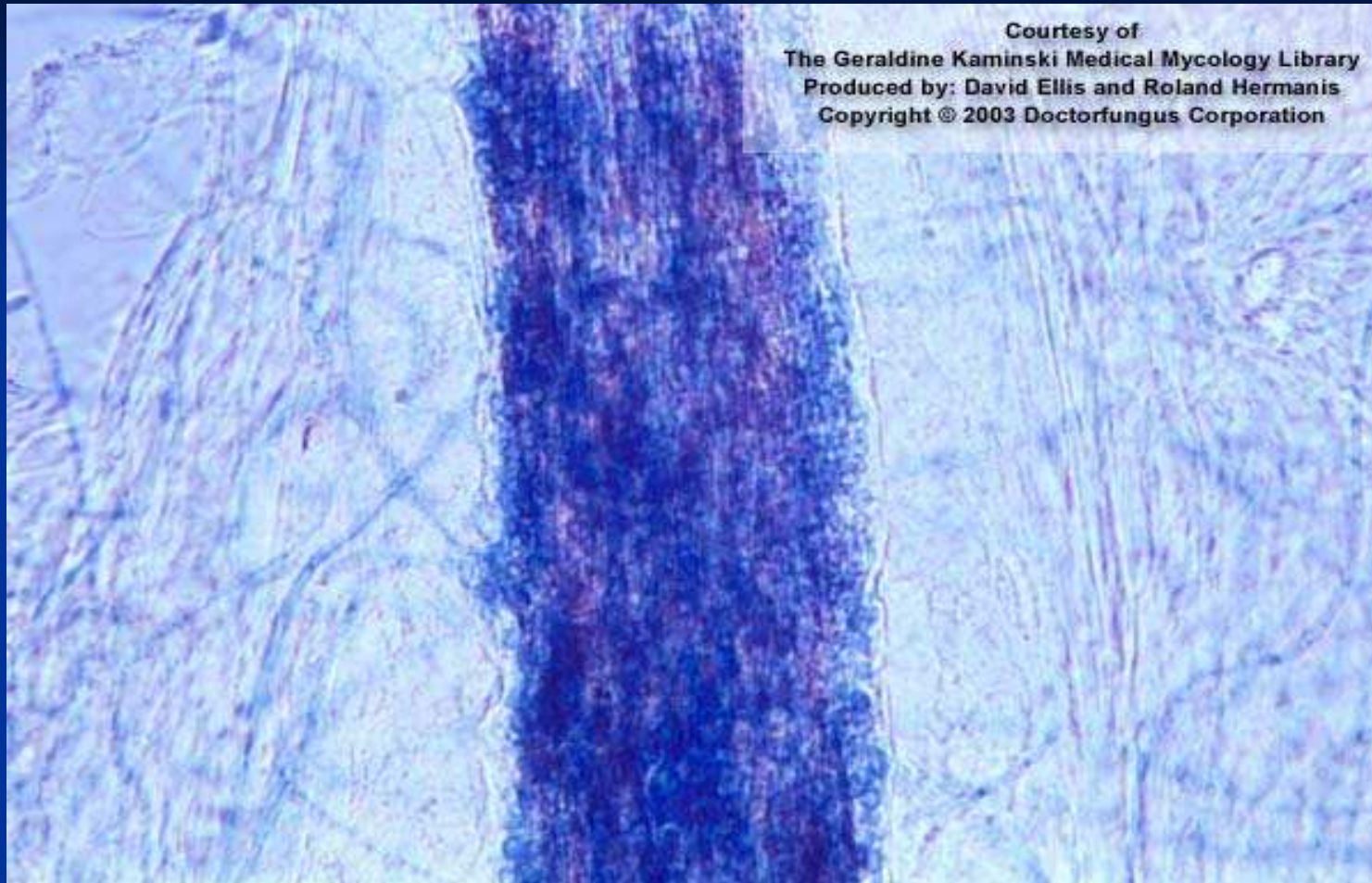
Aspetto tipico

Lampada di Wood (UV, 365 nm)

II. Laboratorio

A. Microscopia diretta

(10-25% KOH)

Ectothrix/endothrix/pelo favico

Courtesy of
The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library
Produced by: David Ellis and Roland Hermanis
Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation

ectothrix

Courtesy of
The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library
Produced by: David Ellis and Roland Hermanis
Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation

endothrics

DERMATOFITOSI
Diagnosi

B. Colturale

Sabouraud dextrose agar

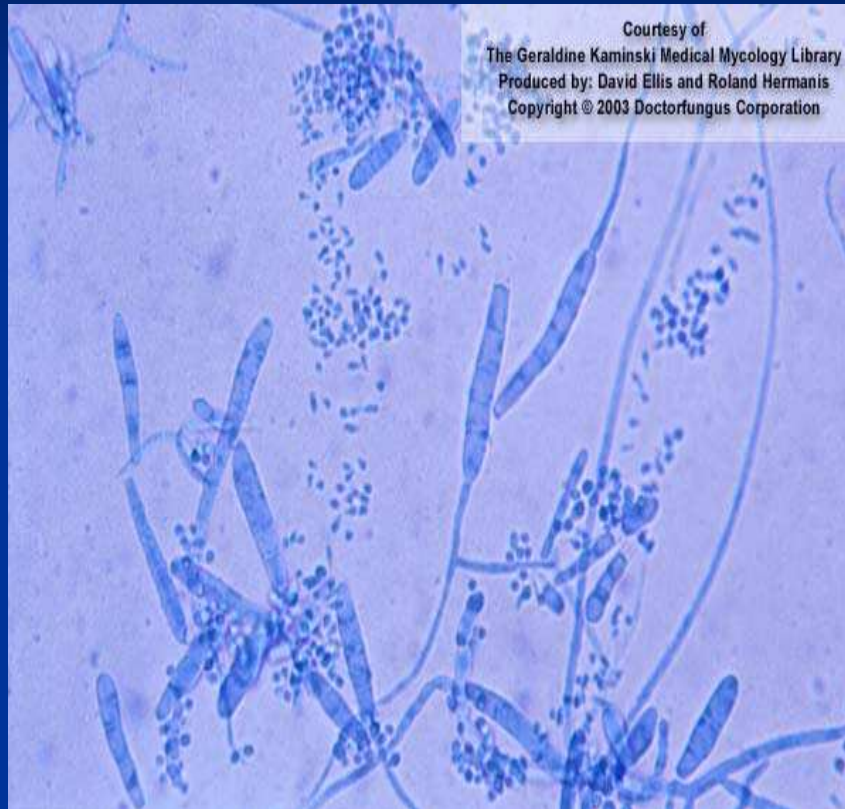
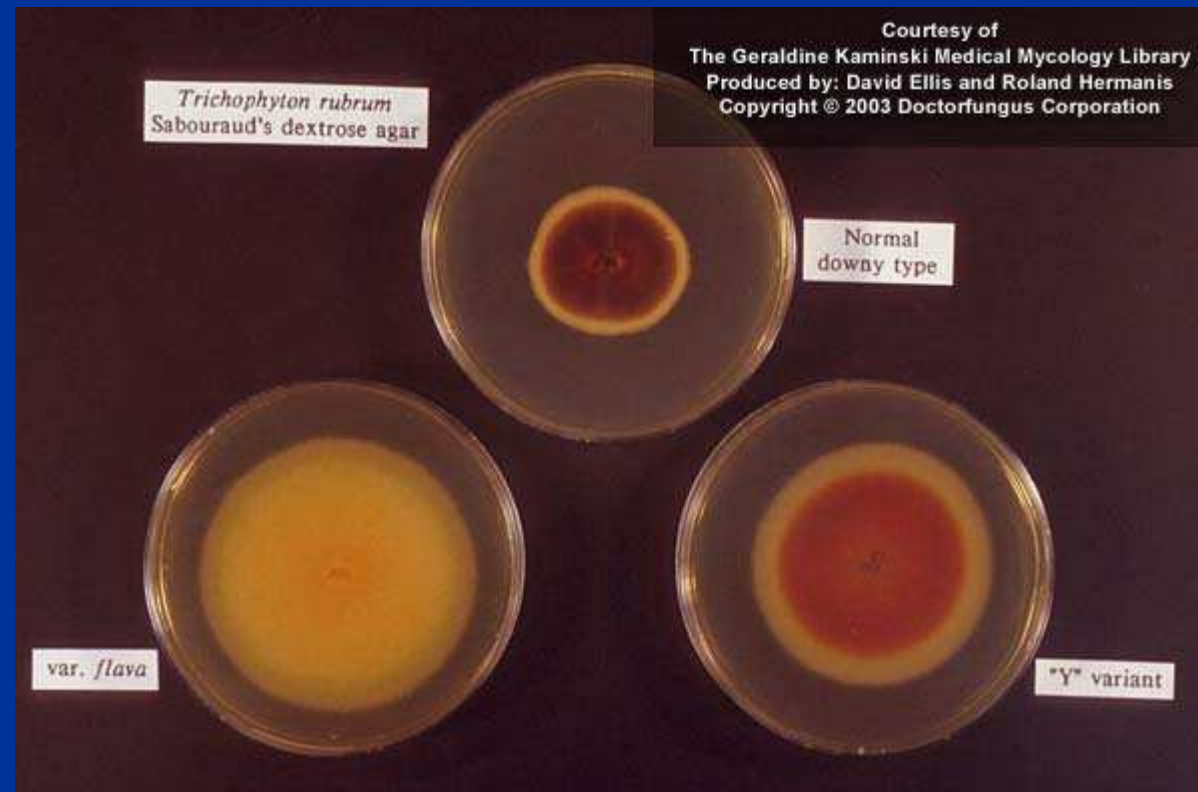
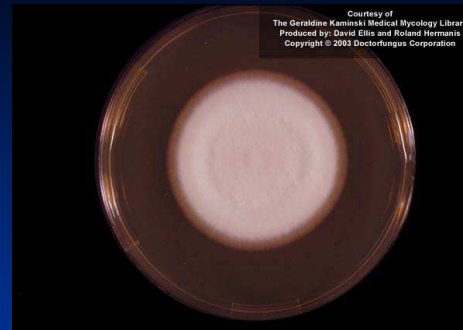
Dermatosel (+ cicloeximide)

DERMATOFITOSI
Identificazione

A. Caratteristiche delle colonie

B. Morfologia microscopica

	Macroconidi	Microconidi
Microsporum	fusiformi	(+)
Epidermophyton	clavati	(-)
Trichophyton	(pochi)cilindrici/ clavati/fusiformi	(+) singoli, a grappolo

Microsporum

Trichophytum

DERMATOFITOSI
Identificazione

C. Test fisiologici

- Test di perforazione del capello in vitro
- Fabbisogno specifico di aminoacidi e vitamine
- Idrolisi dell'urea
- Crescita su grani di riso
- Tolleranza alla temperatura e accrescimento (tempi di crescita)

Aspergillus fumigatus

Aspergillosi

- I miceti del genere *Aspergillus* sono saprofiti diffusi in ogni ambiente (specie ubiquitarie saprofitiche) e contaminanti di svariati substrati.
- *Microhabitat* particolarmente favorevoli sono rappresentati dal terreno e da materiali vegetali in decomposizione: sono, quindi, ritrovabili ovunque, in natura, ed anche negli spazi confinati in cui siano conservati prodotti di origine vegetale (ad esempio: depositi di derrate alimentari, stalle, pollai, magazzini di legname) e nell'aria.

Aspergillosi

- La capacità di *Aspergillus* spp. di crescere su svariati substrati in condizioni ambientali molto variabili rende questi miceti capaci di colonizzare anche tessuti animali sia vitali che non vitali.
- La termofilia di *A.fumigatus*, che ne consente lo sviluppo a temperature sino ad oltre 50°C, spiega la frequenza con cui questo micete è rinvenuto anche in materiali organici in fermentazione (letame, vegetali conservati in silos, ecc.)
- La presenza di aspergilli è stata ripetutamente osservata anche in ambiente ospedaliero.

Aspergillosi
Fattori di virulenza

- Capacità di sintesi dei principali metaboliti (sintesi dei folati, sintesi della lisina, sintesi di uridina)
- Controllo della crescita (ammonio come fonte di azoto)
- Termotolleranza (abilità dei conidi di germinare – picco di sintesi proteica- anche a 42°C)
- Sintesi della chitina: formazione di ife rigide in grado di interagire con l'ambiente
- Sintesi di melanina: protezione dai raggi UV, dalla lisi enzimatica, dalla ossidazione, dalle temperature estreme;
- Produzione di antiossidanti: catalasi, Cu,Zn superossido-dismutasi,
- Produzione di proteasi (ruolo soprattutto in aspergilloma e aspergillosi polmonare allergica)
- Tossine: mitogillina e restrictocina (citotossiche, inibiscono la sintesi proteica, attività ribonucleolitica), gliotossina (inibisce fagocitosi macrofagica e induce citotossicità nelle cell-T)

Aspergillosi

- Alcune specie assumono importanza in Micologia Clinica in quanto patogene per gli animali e per l'uomo, e per la loro capacità di produrre metaboliti tossici; altre specie, viceversa, svolgono un ruolo importante in campo industriale per la produzione di acidi organici o di enzimi, o come *promoter* in processi fermentativi di alcuni alimenti, soprattutto nella cucina orientale.

Aspergillosi

- I membri del genere *Aspergillus* sono responsabili di un gruppo di malattie note come aspergillosi, che possono colpire gli animali e l'uomo: l'invasione tissutale deve però sempre essere considerata come accidentale al ciclo vitale di *Aspergillus*, normalmente saprofitico in natura.

Aspergillosi

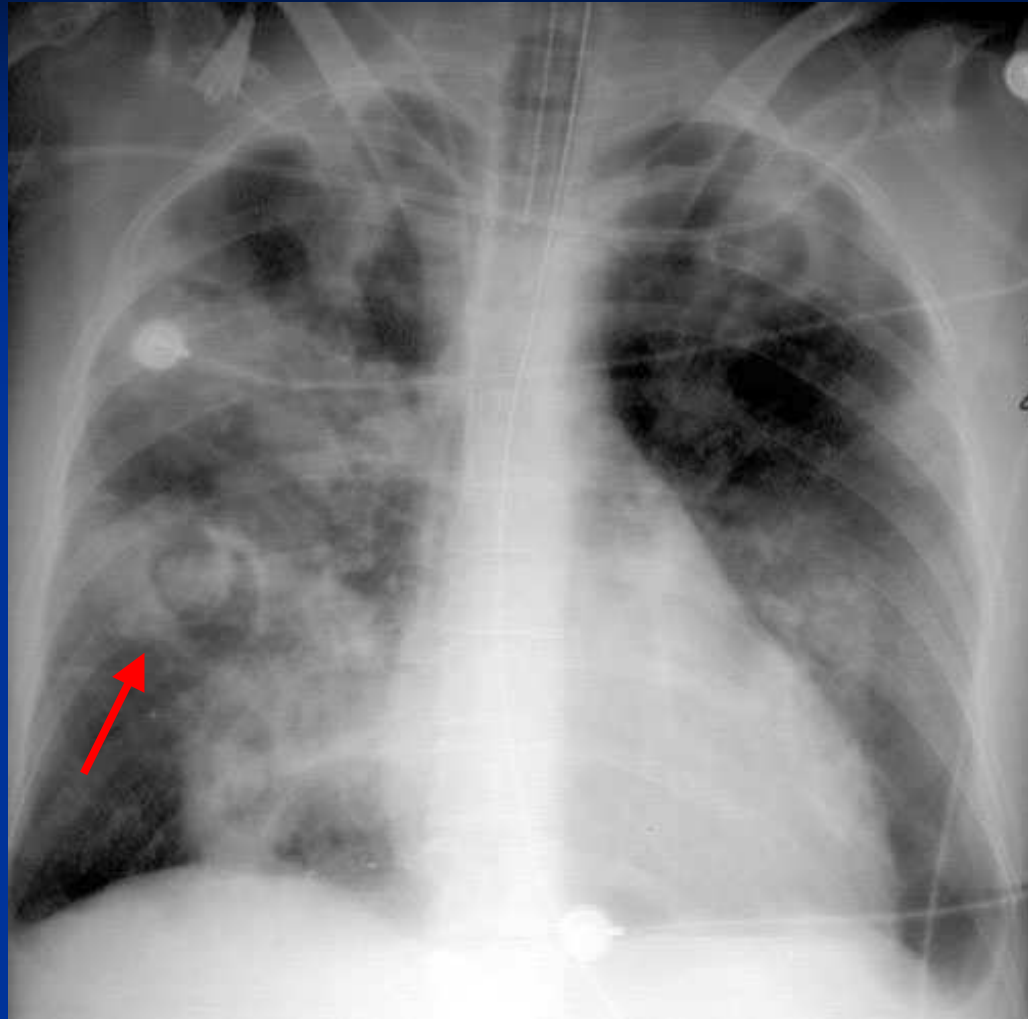
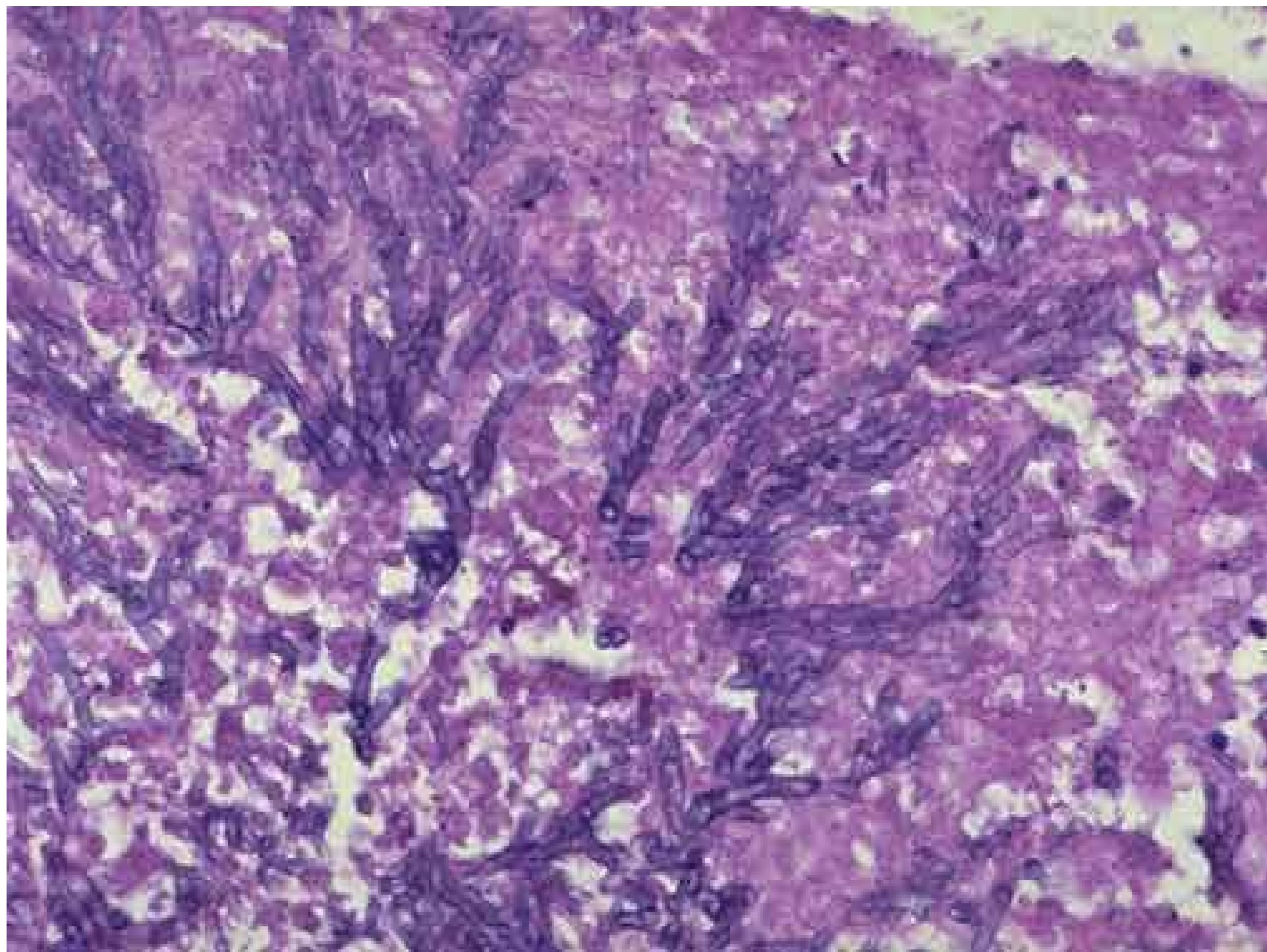
- Le specie responsabili di manifestazioni cliniche sono una ventina. In ordine di frequenza sono:
- *A. fumigatus* (responsabile di circa il 90% dei quadri ad eziologia aspergillare);
- *A. flavus, A. niger, A. nidulans ed A. versicolor*, nel complesso causano l'8-9% delle aspergillosi;
- *A. ochraceus, A. terreus* ed *A. clavatus* che, con un'altra decina di specie, costituiscono il rimanente 1%.
- Il genere contiene più di 180 specie con riconoscimento di almeno settanta forme teleomorfe.

Aspergillosi

- Le forme cliniche includono:
- le **colonizzazioni**, da porre in relazione con l'inalazione di conidi, ovvero – più raramente - all'ingestione di cibi contaminati;
- le **infezioni invasive**, a componente infiammatoria (con localizzazione polmonare, più raramente auricolare, o con disseminazione viscerale);
- le **manifestazioni allergiche**.

Le malattie da infezione aspergillare presentano un carattere tipicamente **opportunistico**, con localizzazioni in vari organi ed apparati di soggetti variamente immunocompromessi, perché sottoposti a prolungati trattamenti immunosoppressivi o chemioantibiotici, o perché affetti da malattie di base altamente debilitanti. Il tipo di affezione dipende quindi dalle condizioni dell'ospite e dalla specie fungina coinvolta.

Aspergillosi invasiva: quadri clinici

- Tracheobronchite necrotizzante da aspergillo
- Aspergillosi bronchiale ostruttiva
- Aspergillosi polmonare invasiva acuta
- Aspergillosi polmonare necrotizzante cronica
- Aspergillosi dei seni paranasali e delle mastoidi
- Aspergillosi primitiva cutanea e dei tessuti molli
- Aspergillosi primitiva dell’apparato digerente
- Aspergillosi disseminata

Invasive aspergillosis in organ transplant recipients (CID 2000)

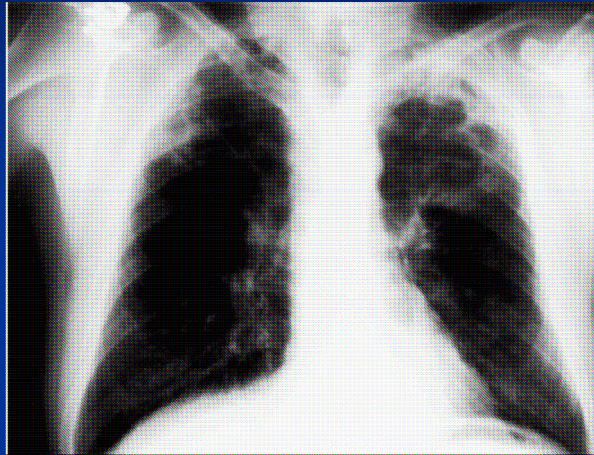
Type of transplant	***Incidence mean (range)***	***time to onset- mean***	***Mortality rate (%)***
Liver	2 (1-8)	17 days	87
Lung	6 (3-14)	120 days	68
Heart	5.2 (1-15)	45 days	78
Kidney	0.7 (0.9-4)	82 days	77
Pancreas	1.3 (1.1-2.9)	NA	100
Small bowel	2.2 (0-3.6)	NA	100

Aspergillosi invasiva: frequenza nell'ospite immonocompromesso (Denning D, 1996)

Condizione clinica	Range %
Leucemia acuta	5-24
Trapianto di midollo allogenico	4-9
Trapianto di midollo autologo	0,5-6
AIDS	0-12
Trapianto di fegato	1,5-10
Trapianto di rene o cuore	0,5-10
Trapianto di polmone o di cuore-polm.	19-26
Malattia granulomatosa cronica	25-40

Scarsi progressi in diagnostica delle aspergillosi invasive

- 1970
  Diagnosi clinica di AI non fatta nel 68% di casi "evidenti" all'autopsia.
  Young, Medicine 1970: 49:147-173
- 1996
  68% dei pazienti con AI provata all'autopsia non avevano ricevuto terapia
  Groll, J.Infect 1996; 33:23-32
- 2006
  Diagnosi prevalentemente basata su CT
  Horger, M. Br J Rad. 2005; 78:697-703

Perché questa scarsità di progressi?

- Manifestazioni cliniche non specifiche
- Diagnostica convenzionale troppo poco sensibile e troppo TARDI!
- Scarsa utilizzazione di procedure diagnostiche invasive

Aspergillus/Candida: ATTENZIONE alle colonizzazioni

I miceti possono essere sia colonizzanti che patogeni, quindi altissima vigilanza va posta nell'interpretazione di:

- colture superficiali
- antigeni,screening in PCR, presenza di anticorpi o metaboliti

Sito sterile

Ottenere un campione clinico

Flora commensale

Clinici: CT, manifestazioni cliniche

Diagnostica di laboratorio:

DIRETTA	INDIRETTA
Coltura	Antigeni
PCR	Comp. Parete cellulare
Microscopia	Anticorpi

Campioni:

Biopsia, sangue, liquor, tamponi,….

Sangue, BAL, liquor,…

Diagnostica per Funghi

Anatomia patologica

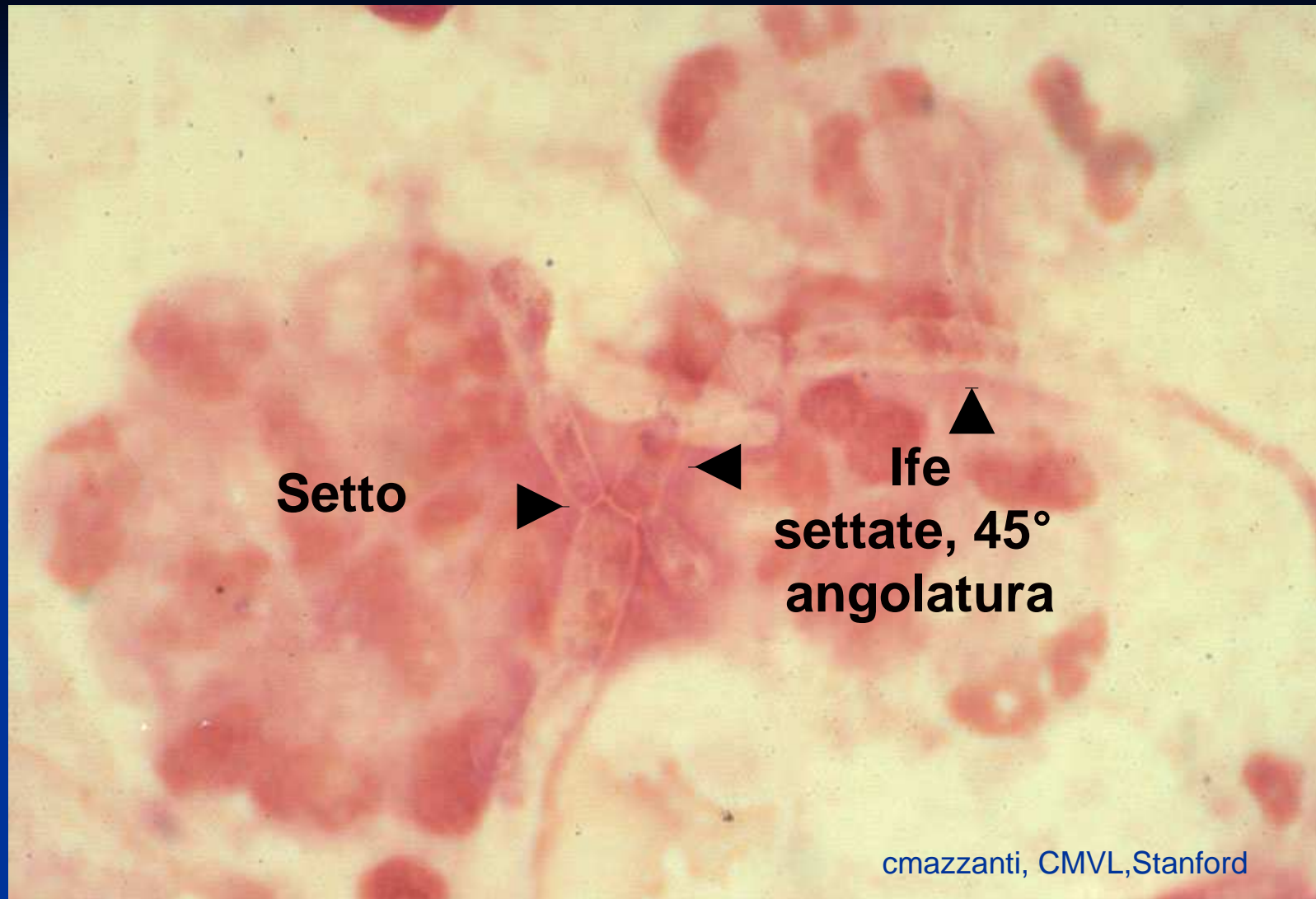
Colorazioni specifiche
Immunodiagnostica

Laboratorio Micologia

Metodi convenzionali:
- Coltura
- Esame microscopico

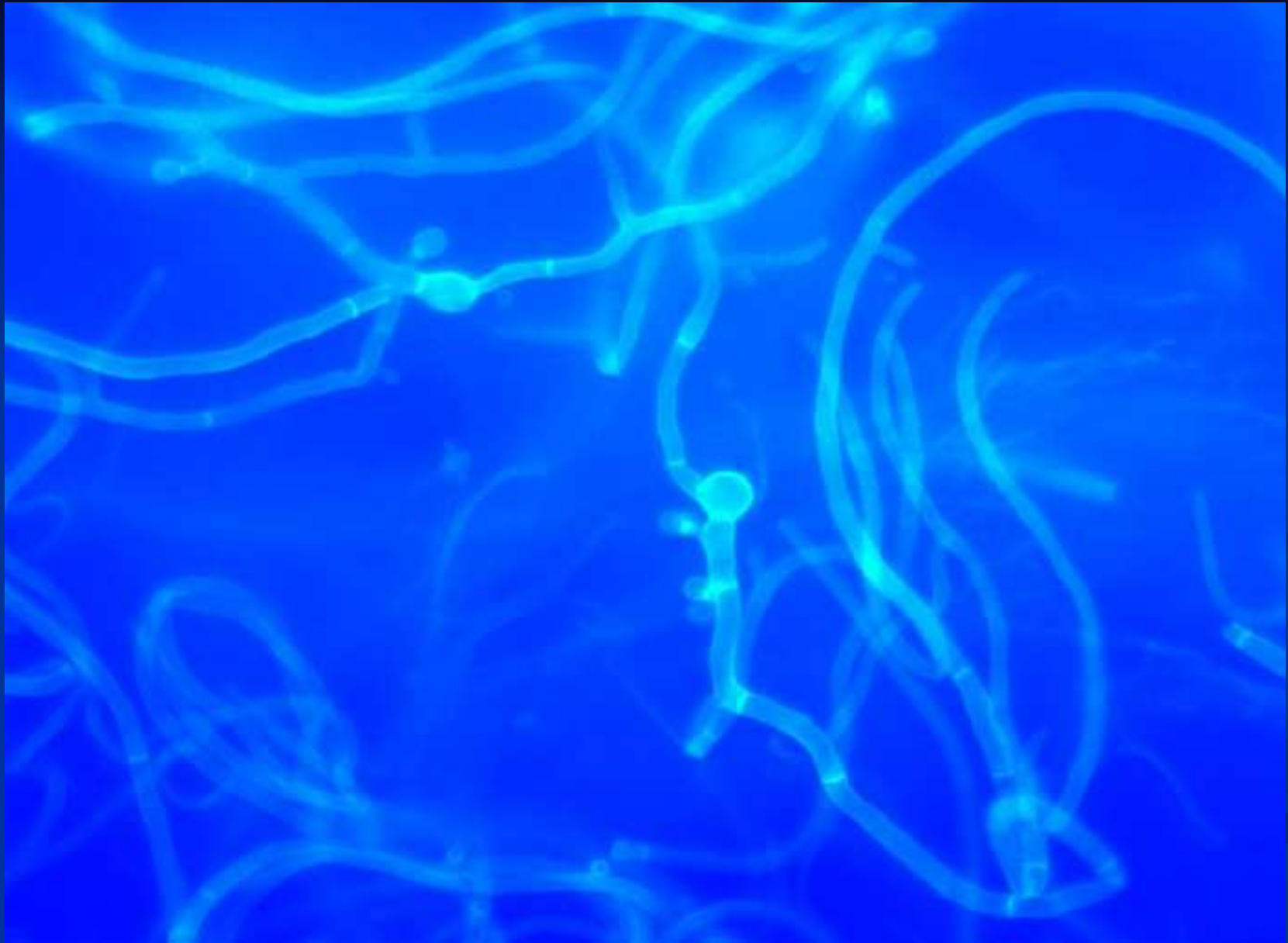
Metodi non convenzionali

Culture/Microscopy Based Diagnosis

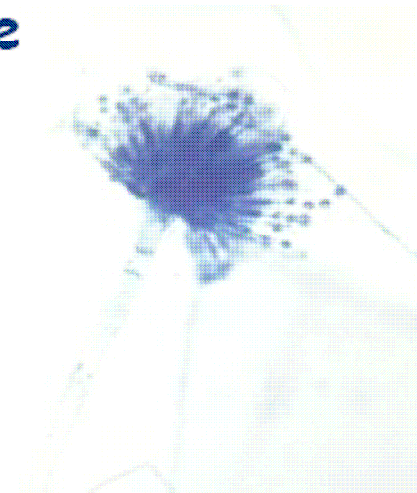
MICROSCOPIA

Chi è?

Microscopia in Laboratorio: cosa è disponibile

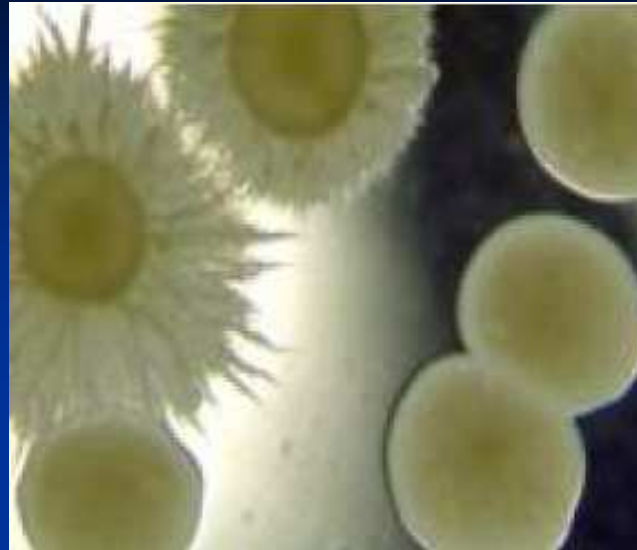
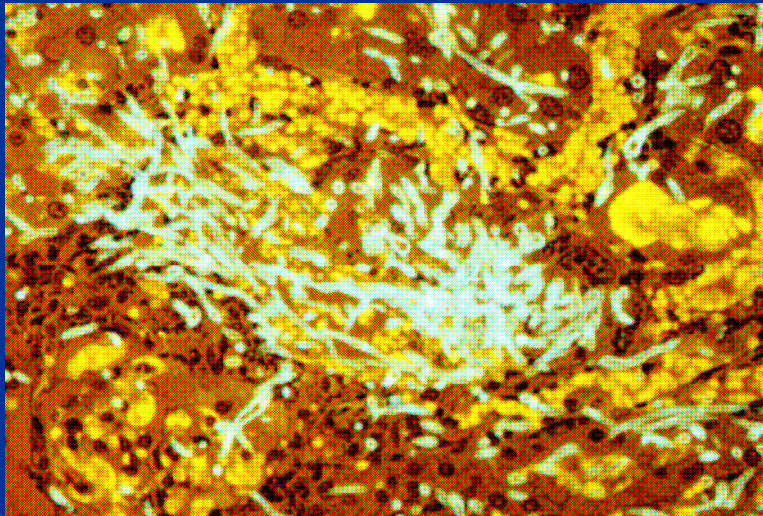
- **Fluorescenza con KOH**
  - **Blankophor**
  - **Calcofluor**
  - **Uvitex 2B**
- **Obiettivo micrometri**
- **Occhio esperto!!**

Specimens eg. BAL oder Tissue			
Yeasts		**Moulds**	
capsular	*C. neoformans*	**Septated hyphae**	***Aspergillus* species** ***Fusarium* species** ***Geotrichum* species**
Small oval yeasts	*Histoplasma capsulatum*		
large (8-15 µm) thick-walled yeasts, budding	*Blastomyces dermatitidis*		
Budding with different sizes (2-30µm), multiple	*Paracoccidioides brasiliensis*	**Unseseptated hyphae**	***Absidia* species** ***Rhizopus* species** ***Mucor* species**
Yeasts, pseudohyphae	*Candida* species		

Microscopic examination/Culture: „Gold standard" diagnosis

- Fast, simple
- Microscopic examination (Calcofluor White Immunfluorescence)
- Sensitivity (48%-63%) 98%
- No genus and species identification
- Hyphal positivity in sterile specimens= proven infection
- Guiding treatment

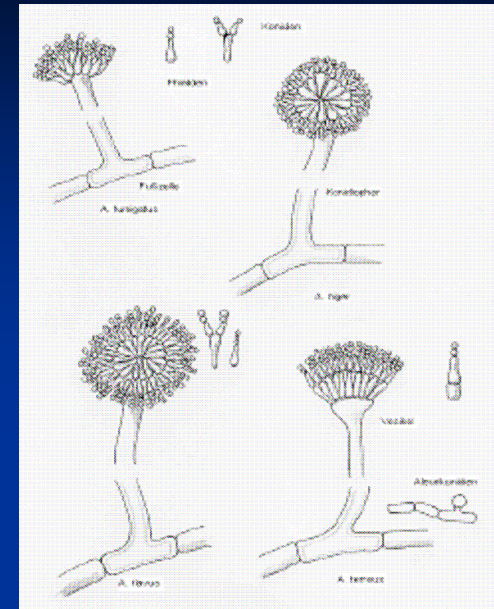
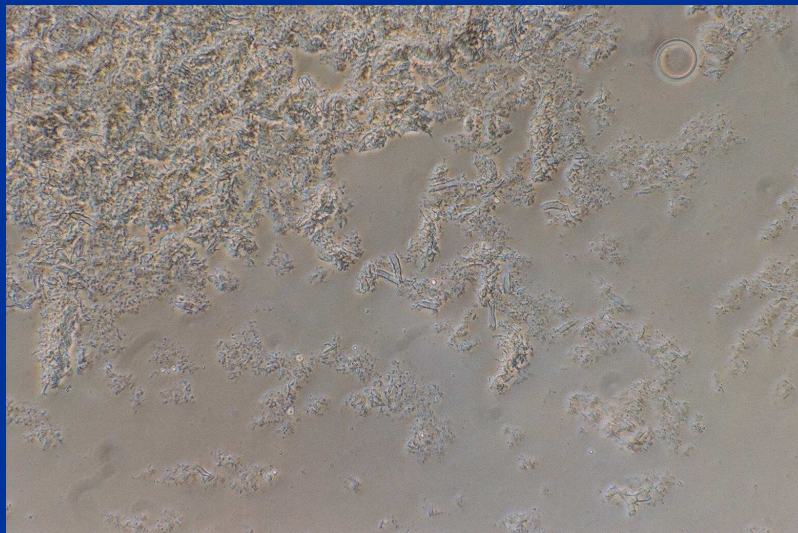
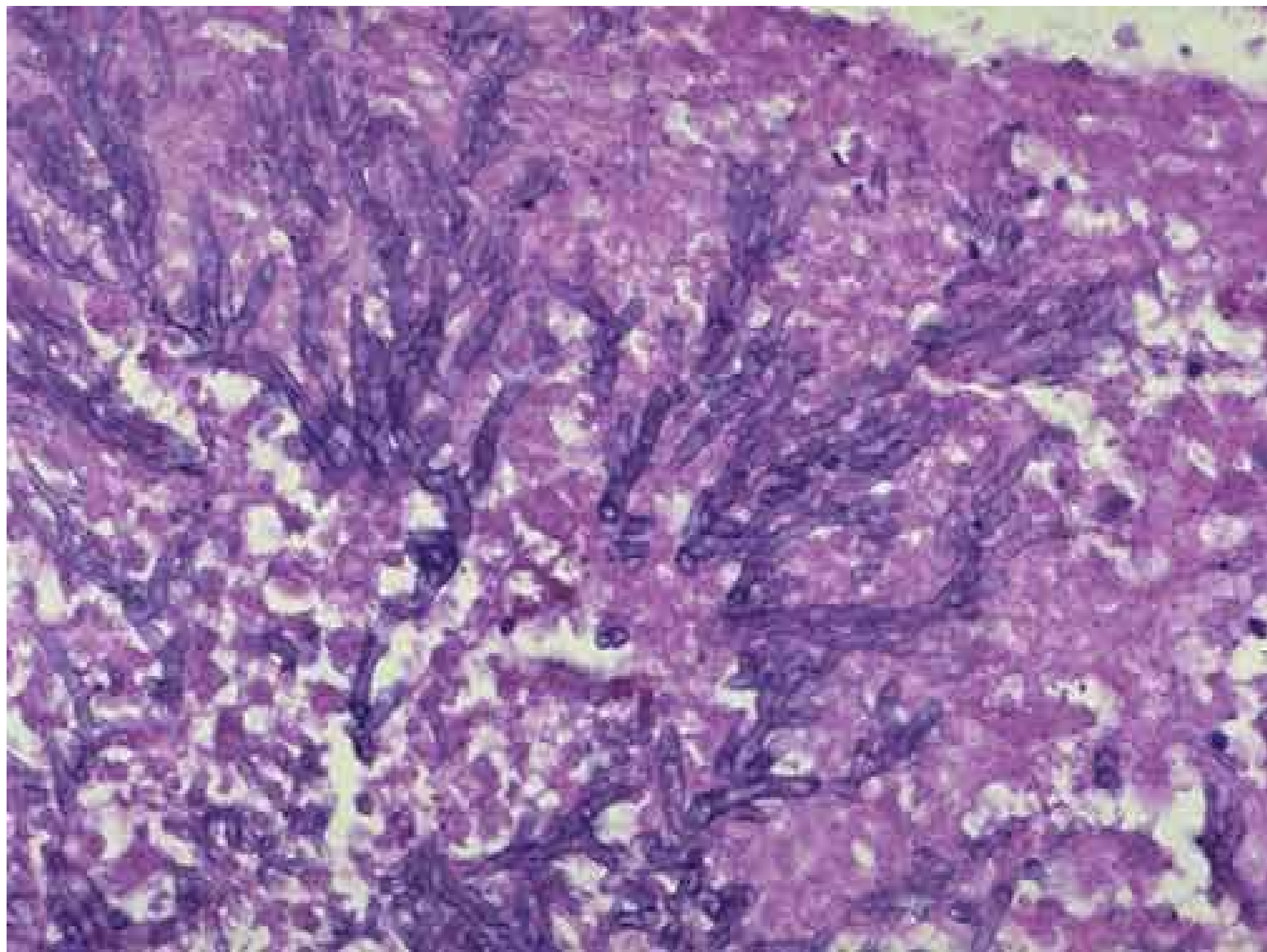
- Positive culture from tissue (~50%)

Denning, 1998

Il lavoro del lab

coltura

Lieviti, pseudoife

Identificazione di specie

Il lavoro del lab

coltura

ife

Identificazione di specie

C O L T U R E

Aspergillosi
Diagnosi colturale

- Le specie del genere *Aspergillus* vengono classificate in base alle caratteristiche **macroscopiche** delle colonie ed a quelle della struttura **microscopica.**

Aspergillosi
Diagnosi colturale

- Il **colore** della parte aerea della colonia, condizionato dal micelio vegetativo, dalle teste conidiali e dall'eventuale presenza di cleistoteci, è un carattere molto importante e viene universalmente accettato per la caratterizzazione delle specie. Il **grado di crescita delle colonie**, in termini di tempi e di dimensioni (diametro), così come **l'aspetto dei margini** delle colonie può variare in funzione della specie (margini netti, irregolari, sottili o spessi, sommersi). La **tessitura di superficie** (vellutata, polverosa, fioccosa, ...) e l'eventuale capacità di presentare aloni concentrici (zonazione), costituiscono altri caratteri tipici in definite condizioni di crescita. Le colonie di *Aspergillus* spp. sono solitamente a rapida crescita, si presentano a tessitura polverosa, granulare, fioccosa, con pigmentazione variabile dal bianco, al giallo, al giallo-bruno, a varie tonalità di verde, al rosso-bruno, al bruno-nero, per lo più costituite da un denso strato di conidiofori eretti.

Micosi invasive: update on conventional diagnosis

Colture

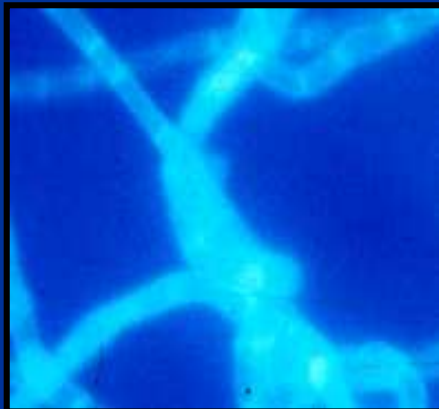
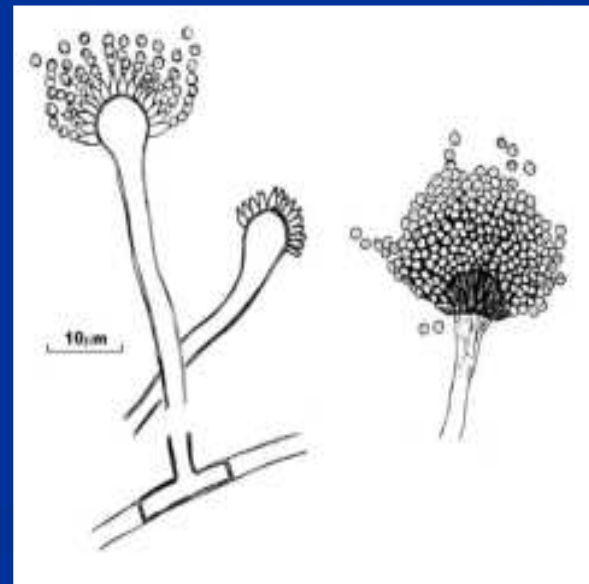
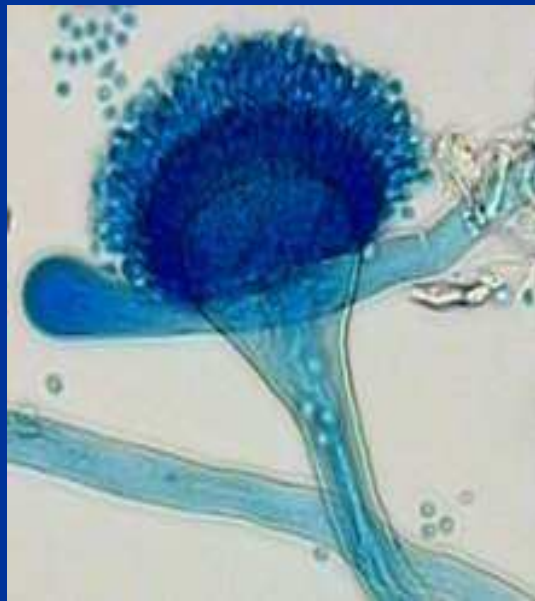
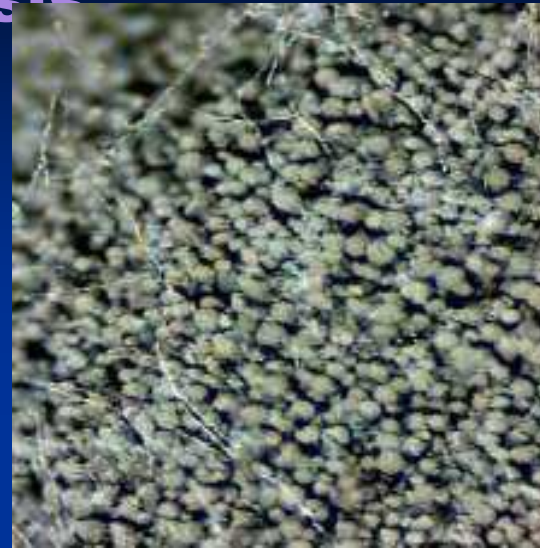
Terreni

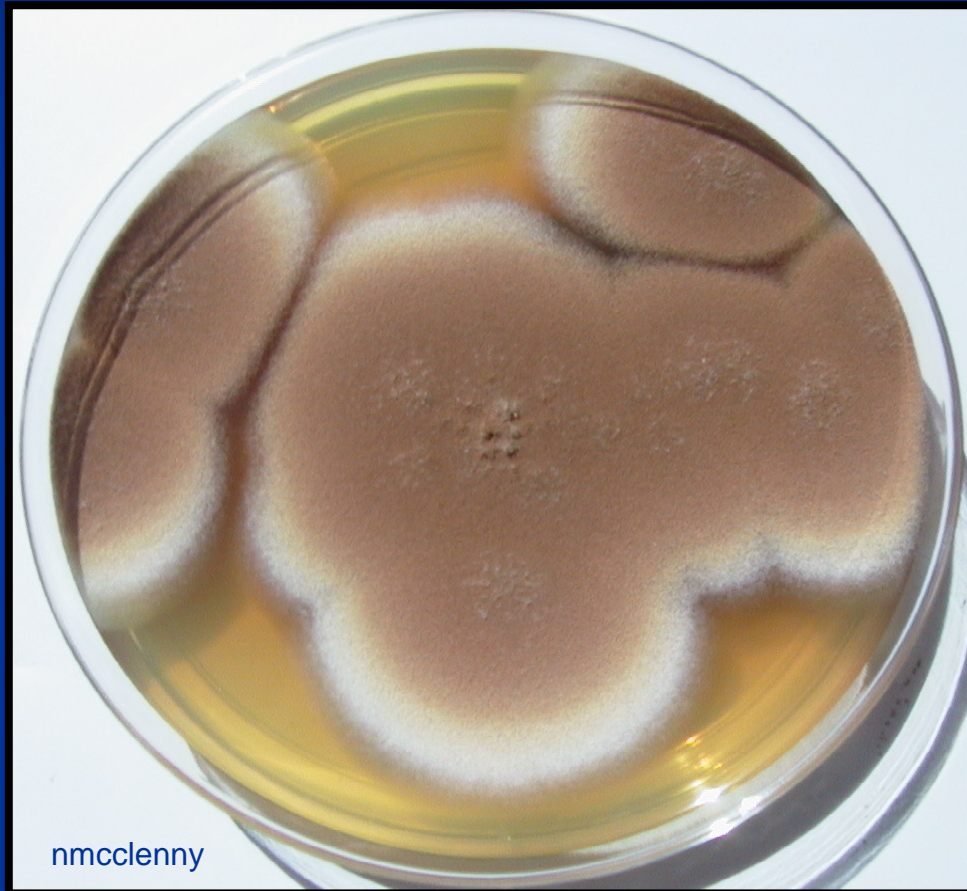
- Isolamento:Sabouraud (+ antibiotics)
  blood agar, chocolate agar
- Identificazione :malt-extract, corn-meal agar, Czapek agar

Incubazione

temperatura	25-30°C
atmosfera	aerobia
durata	2-6 settimane

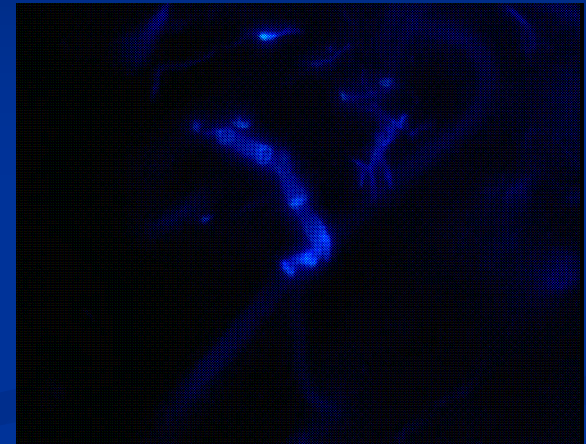
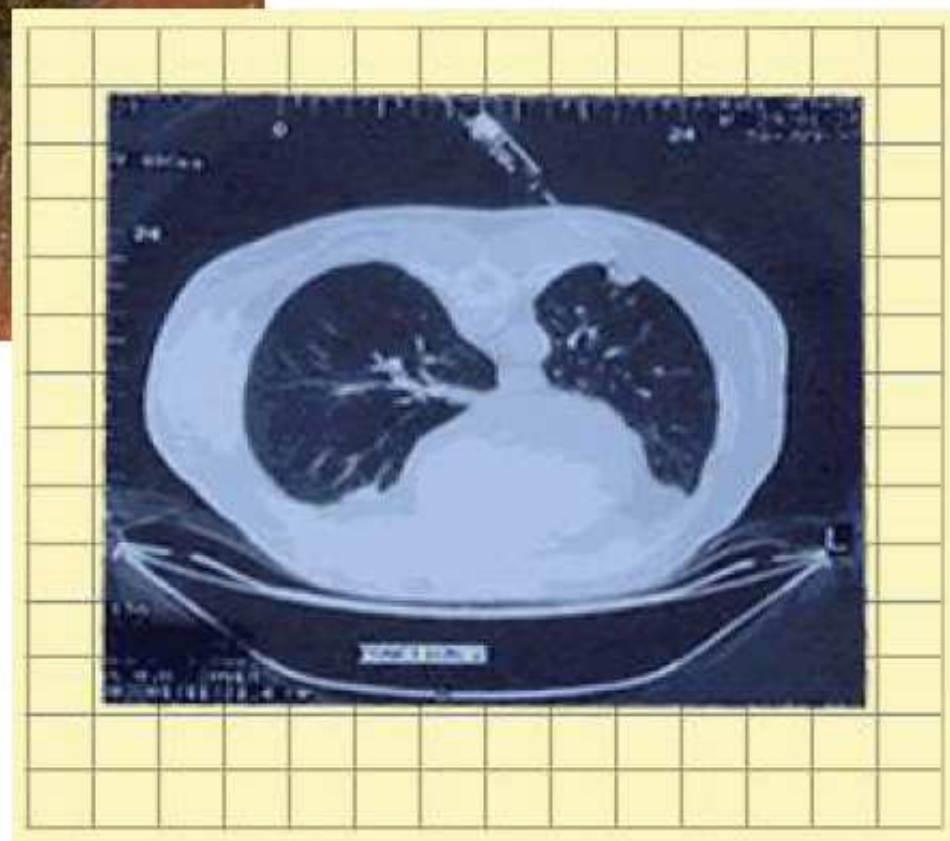
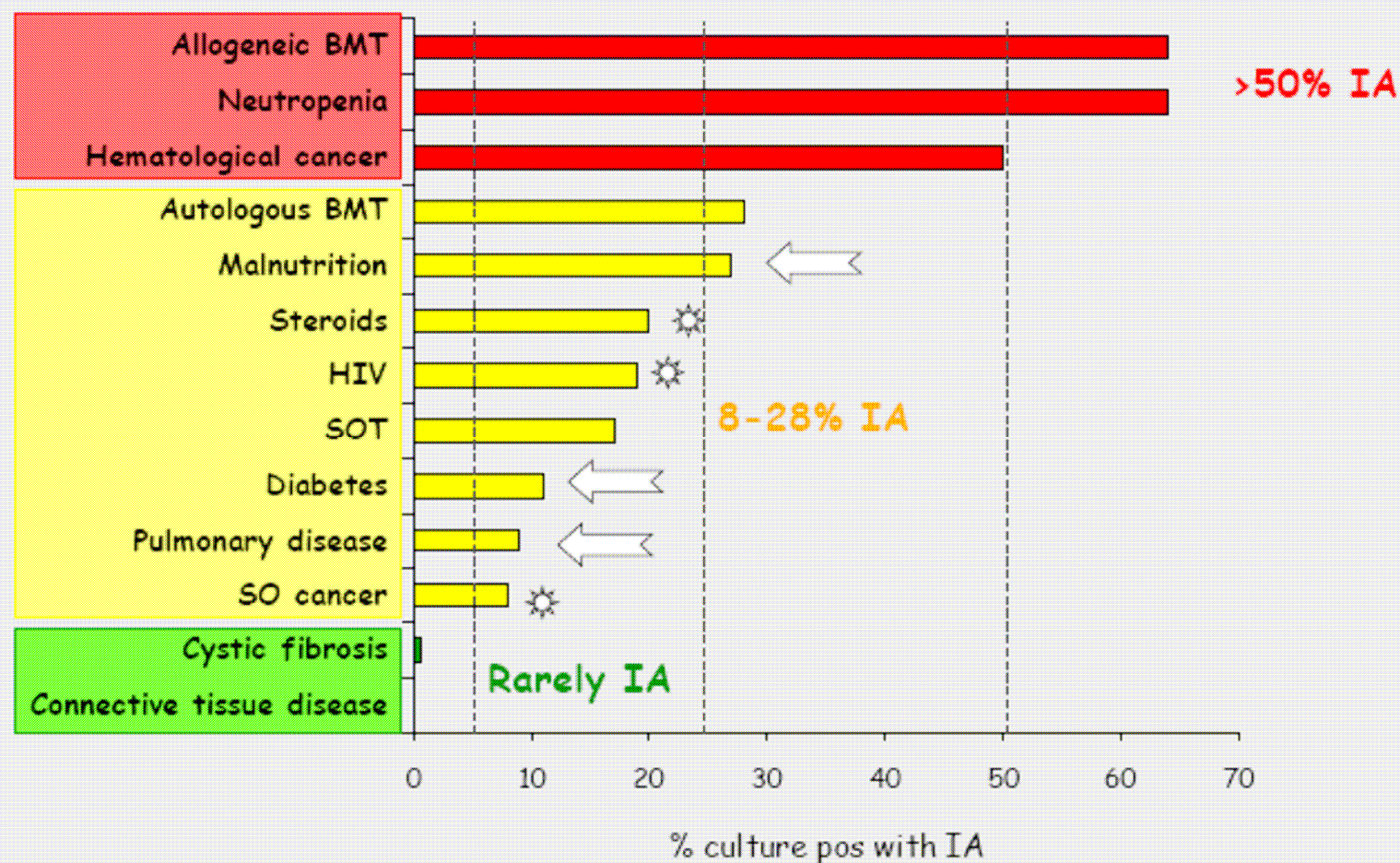
Identificazione rapida di *A. fumigatus*

±1 hr → 24-48 hrs a 35-37° C → 3-7 giorni

Invasive aspergillosis : update on conventional diagnosis

In: Andreoni et al., Medical Mycology Atlas

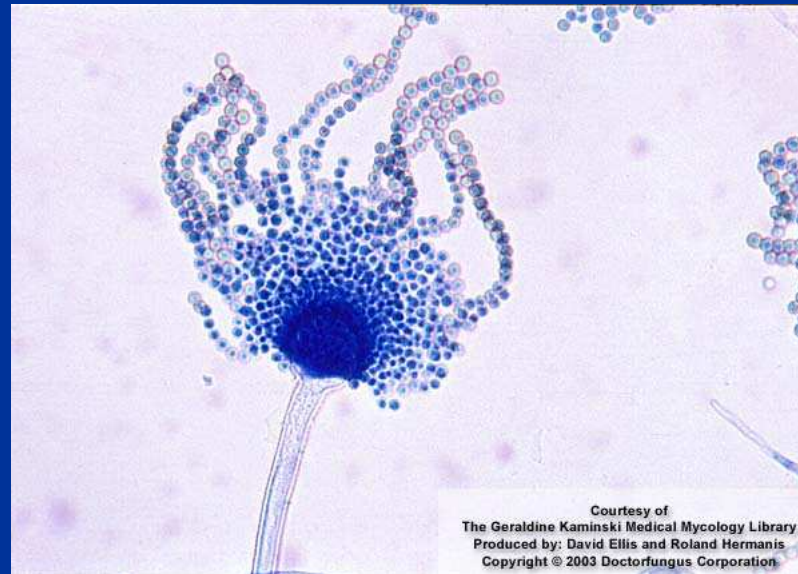
Identificazione fenotipica di altri *Aspergillus* Species

Aspergillus terreus

Coltura e esame microscopico del BAL

- Recuperare l'agente responsabile dal BAL
  - Sensibilità/Specificità < 50%
  - *Comunque*... un indizio critico nella diagnostica dei pazienti ad alto rischio (es. BAL in pz alloBMT)

  - Coltura positiva da BAL (~30%)
  - Evidenza di ife invasive

Kontoyannis et al. Clin Infect Dis 2000; 31:188-9.

Risk factors: PP positive culture
Allogeneic BMT
Neutropenia
Hematological cancer
Autologous BMT
Malnutrition
Steroids
HIV
SOT
Diabetes
Pulmonary disease
SO cancer
Cystic fibrosis
Connective tissue disease
>50% IA
8-28% IA
Rarely IA
0
10
20
30
40
50
60
70
% culture pos with IA
Perfect CID 2001
M. Cavling Arendrup

Saggi di sensibilità *in vitro*:
epidemiologia locale e stato immunitario del paziente

- Lieviti
  - Siti sterili + Candida non albicans
  - Azoli(?)
  - Non responder
- **Miceti filamentosi**
  - **Aspergilli Non fumigatus**
  - **Tutti: non responder**
  - **Terapie prolungate**
  - **Specie rare**

Metodi Non colturali

Non-Culture Based Diagnosis of Invasive Fungal Infections/Aspergillosis

- Galactomannan/Mannan
  - Sandwich ELISA (Platelia)
- PCR
  - TaqMan, LightCycler PCR
  - 18s ribosomal DNA
  - Multi-copy or single target genes
- ß-D-glucan
  - Amebocyte *Limulus* lysate
  - Chromogenic (Fungitell)
  - Kinetic (Wako)

Platelia Aspergillus (Biorad) is a 1-stage immunoenzymatic sandwich microplate kit, for the detection of antigen galactomannan.
BIO-RAD
10 X

- In realtà viene evidenziata la presenza di molecole che contengono "galattofuranosil";
- il polisaccaride della parete cellulare degli aspergilli -galattomannano- ne contiene varie copie;
- Esso viene rilasciato nel torrente circolatorio durante la crescita delle ife fungine nei tessuti.

Causes for false-positive As-EIA

Condition	Mechanism	Reference
Reproducible low-positive results by negative results	Concomitant antifungal treatment, low fungal burden	Bentsen 05
GVHD	Auto-Antibodies	Hamaki 01
Allogeneic HSCT	Intestinal break down-dietary galactomannan	Herbrecht 02
Contamination with cotton	Shared glucopyranose	Dalle 02
Penicillium contamination	Shared galactomannan	Kappe 93, Stynen 92
Fungemia or bacteremia	Cross reactive antigen	Swanink 97, Herbrecht 02
Medications	Contaminating galactomannan	Pinel 03, Ansorg 97, Viscoli 05
Cyclophosphamide treatment	Cross-reactive metabolite	Hashiguchi 94

(1→3)-Beta-D-Glucan Detection Reagent Kit

GLUCATELL™

For Research Use Only

Manufactured by:

704 Main St. • Falmouth, MA 02540

Glucatell(R), a Horseshoe Crab blood-based reagent, measures (1,3)-beta-D-glucan present in patient serum. (1,3)-beta-D-glucan is a fungal wall compound that is shed into the blood during the course of fungal infections. Glucatell(R) detects beta-glucan in the serum of patients.

(1-3)-β-D-Glucan

- Polimeri (1-3)-β-D-di glucosio, parte esterna della parete cellulare dei principali miceti patogeni, eccetto che Cryptococco e zygomiceti.

Si basa sull'abilità della emolinfa del *Limulus* di aggregarsi in presenza di β-D-glucani.

- Cromogenico (Fungitell)
- Torbidimetrico (Wako)

Utility of β-Glucan Detection in Invasive Fungal Infection

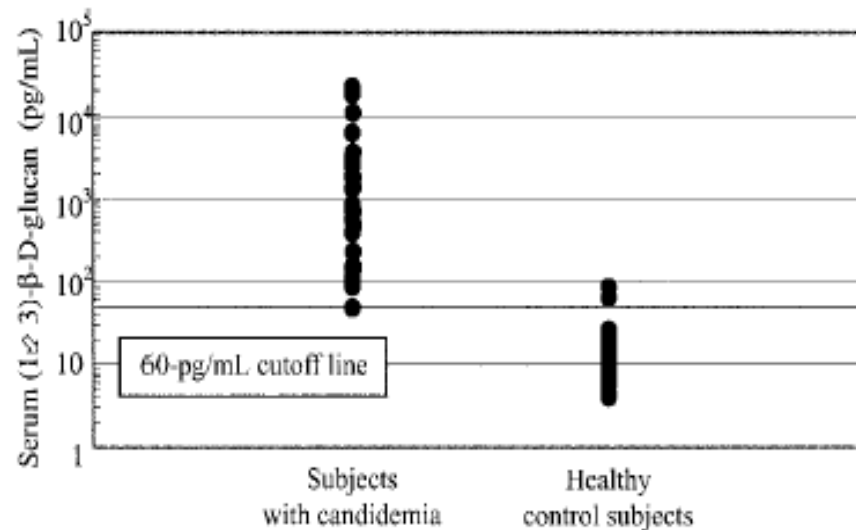



Figure 1. Serum glucan levels in 30 subjects with candidemia and 30 healthy control subjects.

- 30 candidemic pts/30 controls
  - Cut-off >60 pg/ml
- 283 pts AML/MDS (twice weekly samples)
  - Sensitivity: 20/20 IFI pts at least one positive
  - Specificity: 90%
  - Organisms detected: *Candida, Aspergillus, Trichosporon, Fusarium*
- 163 pt IFI/170 controls (single samples)
  - Sensitivity: 70%
  - Specificity: 87%

Obadasi Z et al. *Clin Infect Dis* 2004;39:199-205;
Ostrosky-Zeichner L et al. *Clin Infect Dis* 2005;41:654-9

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2008, p. 1009–1013 Vol. 46, No. 3
0095-1137/08/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.02091-07

Contribution of the (1→3)-β-D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections ∇

Florence Persat,[1]* Stéphane Ranque,[2] Francis Derouin,[3] Annie Michel-Nguyen,[2] Stéphane Picot,[1] and Annie Sulahian[3]

Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Parasitologie, Mycologie Médicale et Maladies Tropicales, Lyon, France[1]; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HM Timone, Marseille, France[2]; and Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France[3]

Received 29 October 2007/Returned for modification 6 December 2007/Accepted 14 December 2007

- **279 pazienti: 117 IFI, 122 a rischio IFI ma neg, 40 volontari.**
- **117 con IFI: 70 proven and probable, 27 emoc +, 20 *Pneumocystis* +**

- **Sono state eseguite GM (galattomannano), M (mannani), BG (beta glucani)**

Risultati

TABLE 1. BG assay results (and efficiency parameters) for the diagnosis of IFI in patients, in populations at risk for IFI, and in subgroups at risk for IPA and/or bloodstream infection

Parameter[a]	IFI patient groups and subgroups/control groups			
	Total IFI patients/ blood donors	Total IFI patients/ patients at risk	Pulmonary aspergillosis/ corresponding patients at risk	Bloodstream infections/ corresponding patients at risk
No. of patients	117/40	117/122	70/100	27/101
No. of patients with a BG ≥80 pg/ml	91/3	91/36	48/27	23/36
Sensitivity (95% CI)	77.8 (70.2–85.3)	77.8 (70.2–85.3)	68.6 (57.7–79.5)	85.2 (71.8–98.6)
Specificity (95% CI)	92.5 (84.3–1.0)	70.5 (62.4–78.6)	73.0 (64.3–81.7)	64.4 (55.0–73.7)
LR^+ (95% CI)	10.4 (3.5–30.9)	2.64 (1.97–3.53)	2.54 (1.77–3.64)	2.39 (1.76–3.24)
LR^- (95% CI)	0.24 (0.17–0.34)	0.32 (0.22–0.45)	0.43 (0.30–0.62)	0.23 (0.09–0.57)
Yule Q	0.95	0.79	0.71	0.82

[a] LR, likelihood ratio. The Yule Q coefficient measures the strength of the association between the test results and the disease (0, null; 0.01 to 0.09, negligible; 0.10 to 0.29, light; 0.30 to 0.49, moderate; 0.50 to 0.69, strong; 0.70 to 1, very strong).

TABLE 4. Comparison of BG assay versus GM and M ELISA tests for the IPA and bloodstream infection patients

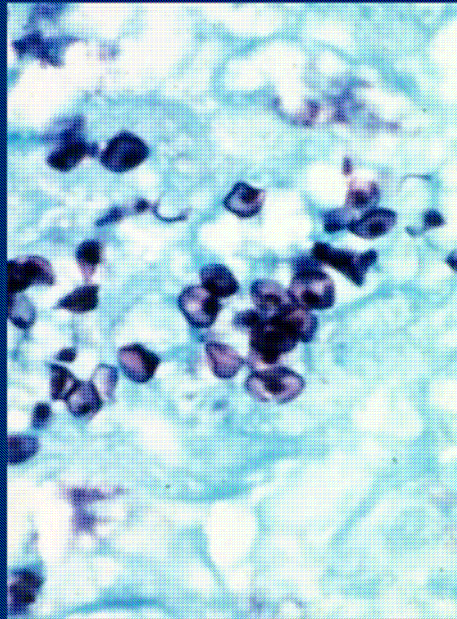
BG status	IPA patients (n = 70)			Candidemia patients (n = 26)		
	GM +	GM –	Kappa (95% CI)	M +	M –	Kappa (95% CI)
BG +	34	14	0.43 (0.22–0.65)	10	10	0.07 (0.32–0.47)
BG –	5	17		1	2	

Which test most useful?

- Kawazu (2004)
  - 9[...] pts (11 proven [...]rob IA): [...] vs PCR vs β-gluca[...]
  - GM mo[...] [...]55%)
  - Earli[...] [...]ian 10 da[...]
- Pazos (20[...]
  - 40 [...] [...]ucan
  - Identical se[...] [...]ty (89.6%)
  - β-glucan p[...]ve [...]er
  - Combination impr[...]d spec[...]ity (100%)

Positive β-D-glucan in Serum
Accepted Mycological Criteria In EORTC

Kawazu et al, *J Clin Micro* 2004;42:2733-41;
Pazos et al, *J Clin Micro* 2005;43:299-305

- Persat et al. JCM 2008: 279 pz, 77.8 sensibilità, 92.5 specificità

Pneumocystis jiroveci

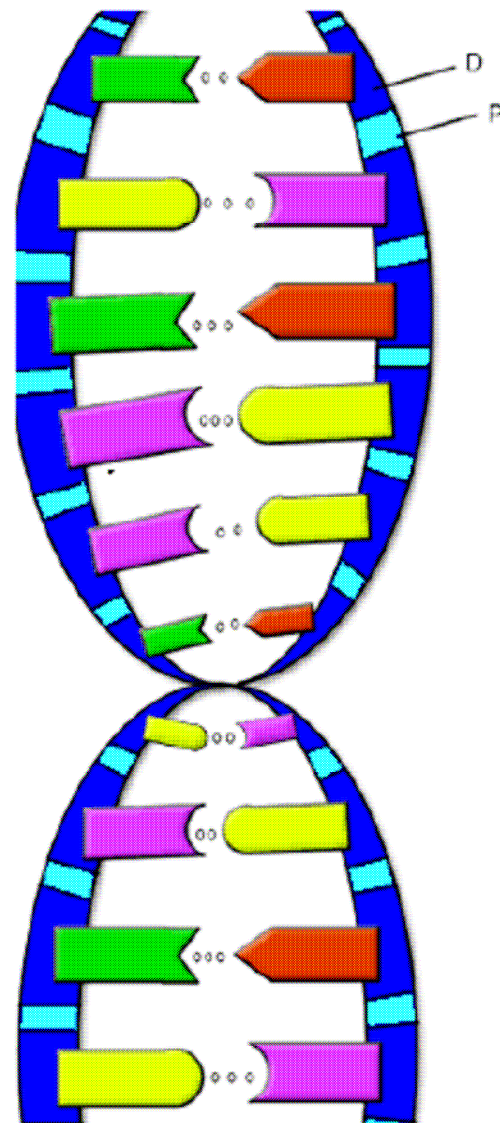
9 Patients with infection

Serial screening of BDG

Cut-off 80pg/ml

BGD positive in all 9 cases

BDG decreased under therapy

Marty F, M 1606, ICAAC, 2006

Thymine

 Adenine

 Guanine

 Cytosine

D = Deoxyribose (sugar)

P = Phosphate

ooo Hydrogen Bond

Detection of Fungal DNA by PCR

Clinical specimens

- blood
- serum
- tissue biopsies
- BAL
- CSF

Different protocols

- DNA extraction
- PCR design
- Amplicon detection

Time point of sampling

DNA Amplification

Species- / genus-specific genome sequence

- HSP 90
- lanosterol demethylase
- chitin synthase
- aspartic proteinase
- actin

Single copy genes
nested PCR

Highly conserved genome sequences

- 18S rRNA gene
- 28S rRNA gene
- mitochondrial genes

Multi copy genes

PCR FOR EARLIER DETECTION OF ASPERGILLOSIS IN BONE MARROW TRANSPLANT RECIPIENTS

Hebart, Einsele et al. J Infect Dis 2000; 181:1713-9

84 patients/1193 blood samples

69 without Aspergillosis

17 (24%) PCR pos → 15% false positive

52 (76%) PCR neg 0% false negative

For at least 2 consecutive PCR +ve results

sensitivity	75%	63%
specificity	96%	78%
PPV	42%	45%
NPV	98%	44%

Lass-Florl, B J Haem 2001

Lass-Flörl, JCM 2005* ..under therapy...

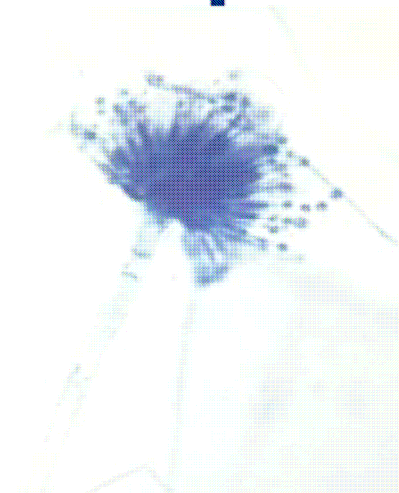
Problems with PCR

Contamination

- -extraction
- -setup, probes
- -reagents
- -environmental

Lack of standardisation

- -in-house assays
- -comparisons difficult

Lack of interpretation of the data

PCR for Invasive Moulds

Design	Sens (%	Spe	Ref
Pan-fungal	100		1997;35:1353-60
Pan-fungal			180-4
Asp. sp.			00;181:1713-9
Asp. sp.			428-35
Asp. sp			2001;33:1504-12
Asp. sp.	4		BJ 004;125:196-202

PCR not (*yet*) accepted for mycological criteria

- Variable sensitivity / specificity
- Limited per test positivity
- Technical false positives/negatives
- Lack of standardized targets/reagents
- Not externally validated

DIAGNOSTICA RAPIDA DI ASPERGILLOSI INVASIVA IN PAZIENTI EMATOLOGICI: EFFICACIA DELLA RICERCA DI DNA ASPERGILLARE IN SIERO E SANGUE PERIFERICO RISPETTO AI METODI CONVENZIONALI.

Lo Cascio G.2, Ligozzi M. 1,Scalet G.1, Maccacaro L. 1 , Bertoncelli A.1, Nadali G.3, Krampera M.3, Fontana R. 1

Congresso Nazionale AMCLI Roma 2005

Dal Gennaio all'Aprile 2005 92 pazienti ematologici in fase di aplasia midollare:

ricerca di antigene galattomannano su siero,

ricerca di DNA aspergillare su prelievi di sangue intero e siero

per un totale di 311 campioni:

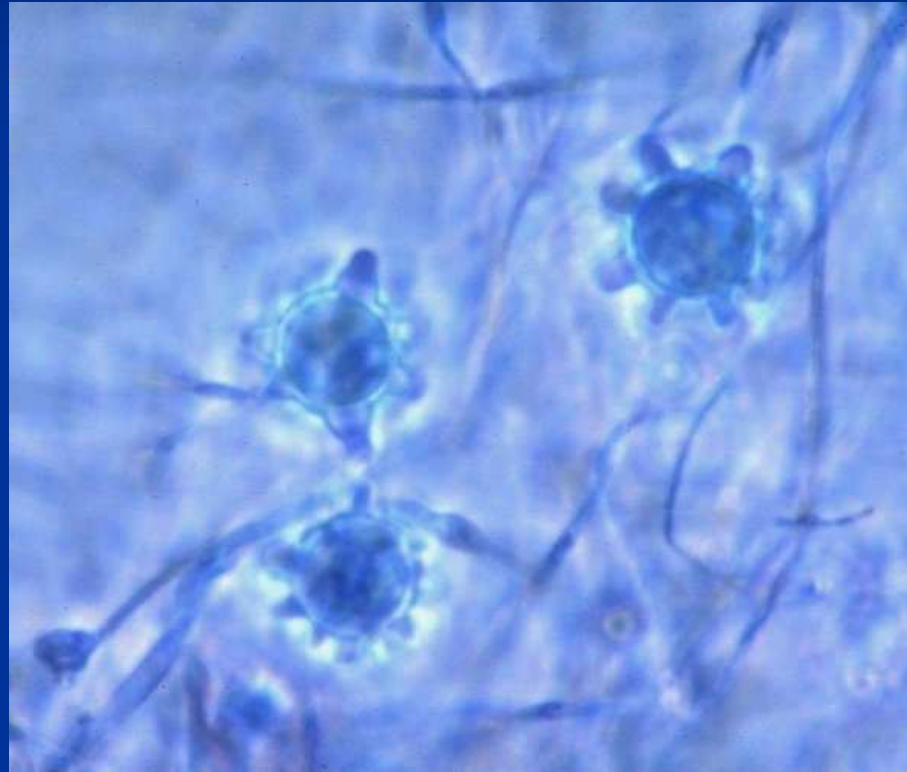
7 (7,6%) pazienti sono risultati positivi all'antigene galattomannano, 41 (44.5%) pazienti sono risultati positivi alla nested PCR su sangue intero, 28 (30.4%) pazienti sono risultati positivi alla nested PCR su siero.

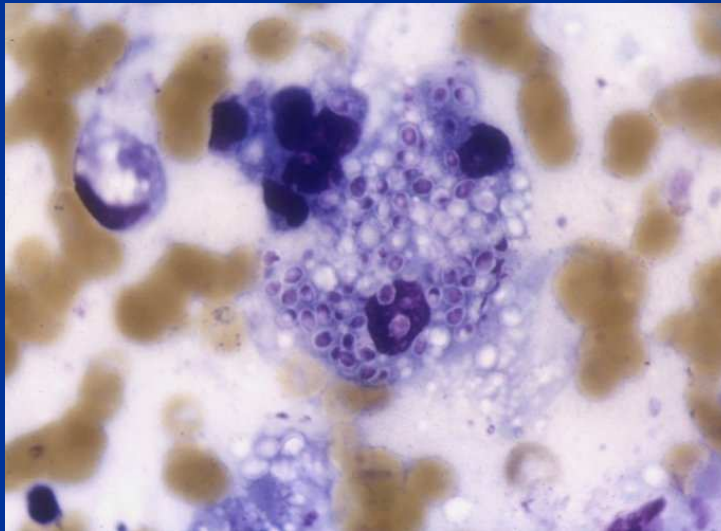
3 con AI provata, 3 con AI probabile e 2 con AI possibile.

	Ricerca del galattomannano	Nested PCR su sangue intero	Nested PCR su siero
Sensibilità	62.5 %	100%	44%
Specificità	97.6%	61.4%	71%
Valore predittivo positivo	71.4%	19.5%	14.2%
Valore predittivo negativo	96.4%	100%	92.2%
LR +	26	2.56	1.54
LR-	0.38	0	0.78

Possibilità Diagnostiche: Aspergillosi

- Ancora non disponibile una tecnica “gold standard”
- Colturale di escreato, BAL, tessuti, poco specifico, sensibilità solo del 25 -50% nei casi “provati”
- Anticorpi non utili nella maggior parte dei pazienti
- Ricerca degli antigeni
- PCR sotto studio
- Imaging: RX, CT scan molto utili.

Histoplasma capsulatum

Istoplasmosi

- l'istoplasmosi è un'infezione micotica intracellulare del sistema reticoloendoteliale, causata dall'inalazione di conidi di *Histoplasma*.

Istoplasmosi

Patogenicità:

- Nella maggior parte dei casi, l'istoplasmosi risulta inapparente, subclinica o benigna, con una sintomatologia modesta. Nella forme benigne, può svilupparsi a livello polmonare un quadro anatomo-patologico simile a quello tubercolare. Nel 5-7% dei casi si manifesta una malattia cronica polmonare. Sempre a livello polmonare si riconoscono forme acute fulminanti, cavitarie o simil-tumorali. Oltre alle forme polmonari sono da segnalare forme cutanee e, in soggetti immunodepressi, soprattutto se HIV positivi, forme sistemiche e disseminate.

Istoplasmosi

- **EPIDEMIOLOGIA**

- L'*habitat* naturale del micete è rappresentato dal suolo, specialmente quello contaminato con guano di uccelli o di pipistrelli.
- Il genere *Histoplasma* comprende una sola specie, *H. capsulatum*, che riconosce due varianti: *H. capsulatum var.capsulatum* e *H. capsulatum var.duboisii* (endemico in Africa). *H. capsulatum var. capsulatum* presenta una distribuzione ubiquitaria, essendo stato segnalato in tutti continenti. Le aree tropicali sono quelle dove il micete è più diffuso, risultando endemico in Nord-America e America Latina. Altre zone endemiche comprendono Africa, Australia, Malesia e India.
- Tra i miceti dimorfi, è **l'unico presente in Italia**, anche se con diffusione molto limitata (Appennino Tosco-Emiliano).
- *H. capsulatum* var.*duboisii* è invece circoscritto a Paesi africani, dove colpisce primati e uomini.

Istoplasmosi

- Patogenicità
- E' stata dimostrata la capacità del fungo di legarsi, tramite il recettore CD18, a monociti di derivazione macrofagica, macrofagi alveolari e polinucleati. La virulenza sarebbe legata alla proprietà di modulare il pH fagolisosomale, con aumento di ferro intracellulare essenziale per la sopravvivenza del micete.

Asymptomatic	1.Occurs in 50-90% of infected individuals
Acute & symptomatic	
1.- Self-limited (Flu-like syndrome)	1.It usually goes unrecognized
2.- Acute Pulmonary	1.Diffuse or localized pneumonitis. 2."Buckshot" appearance on chest radiograph with subsequent calcification in cases of heavy exposure. 3.It may be severe enough to require ventilatory support
3.- Acute Pericarditis	1.Frequently associated with intrathoracic adenopathy 2.Pericardial fluid is usually sterile
4.- Rheumatologic manifestations	1.Arthralgias, arthritis, erythema nodosum, and/or erythema multiforme
Chronic Pulmonary	1.Radiologic presentations include a Ghon complex suggestive of tuberculosis, histoplasmoma, and cavitary disease
Disseminated	1.See Disseminated Histoplasmosis table (below)
Fibrosing Mediastinitis	1.Rare form that produces an intense deposition of fibrotic tissue in the mediastinum encroaching vital structures such as the superior vena cava, esophagus and trachea.

Istoplasmosi- diagnosi di laboratorio

- **Aspetti macroscopici**: a 25°C colonie a crescita lenta (2-3 settimane), con tessitura da granulare a vellutata, a cotonosa. Il colore, inizialmente bianco, tende a diventare bruno. Il *verso* può risultare da giallo a giallo-bruno. La crescita del micete è stimolata da terreni ricchi, quali BHI, addizionato a sangue, anche se le caratteristiche si apprezzano meglio su SDA. Le colonie non sono sensibili a cicloeximide.
- A 37°C, crescita su BHI di colonie bianche, lisce, lievito-simili, cremose. La fase lievitiforme è inibita da cicloeximide.

Istoplasmosi- diagnosi di laboratorio

- **Aspetti microscopici**: a 25°C le ife sono settate e ialine. I conidiofori, corti e indifferenziati, originano ad angolo retto da ife vegetative. I macroconidi sono larghi (8-20 mm), rotondi, unicellulari, ialini, a parete spessa e tubercolata. I microconidi unicellulari (2-6 mm), ialini, rotondi o piriformi, a parete liscia o rugosa, originano da corte ramificazioni ifali o direttamente dalla superficie di quest'ultime.
- Sonde Molecolari specifiche.

Coccidioides immitis

Coccidioidomicosi

- **Epidemiologia – Patogenicità**: micete responsabile di coccidioidomicosi, malattia infettiva altamente contagiosa. L'infezione può manifestarsi in forma asintomatica, in forma acuta benigna polmonare, o come grave malattia cronica, spesso mortale, prevalentemente a localizzazione polmonare. In soggetti predisposti, l'infezione può evolvere in forma sistemica, con interessamento di cute, tessuti sottocutanei, articolazioni, linfonodi, meningi e SNC.

Coccidioidomicosi

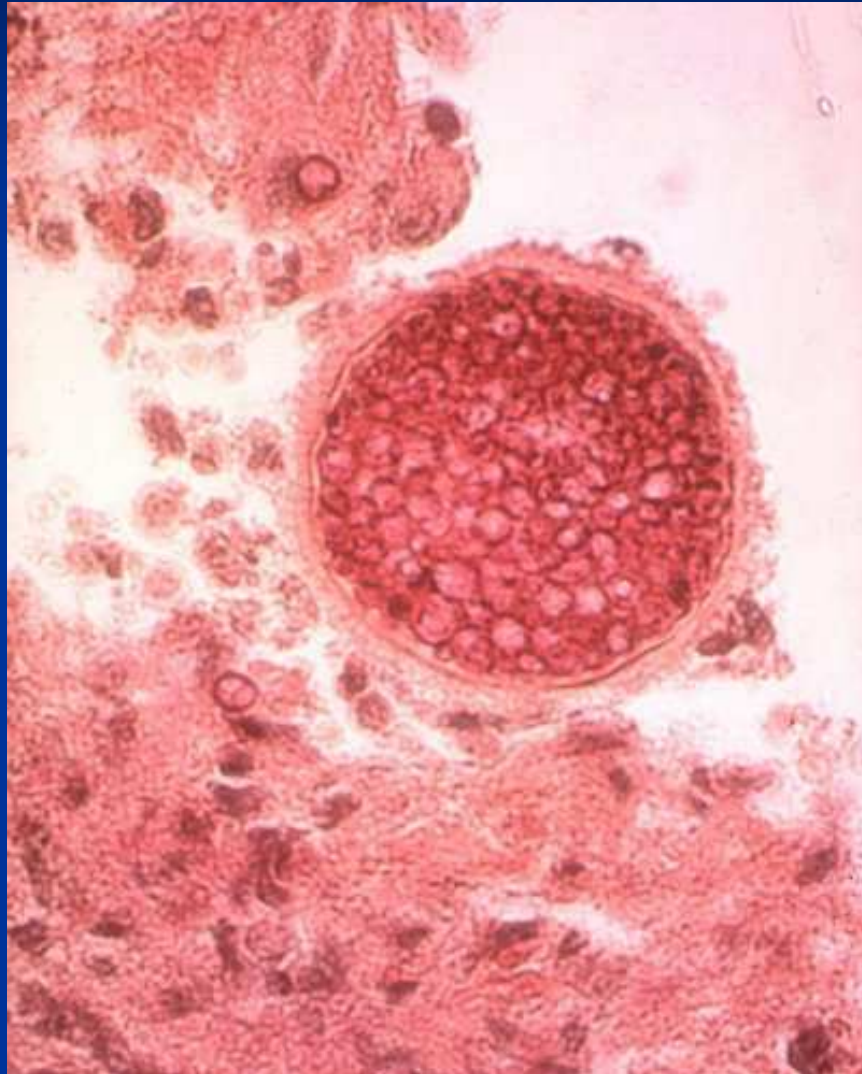
- Il fungo è endemico nelle zone semi-desertiche al confine tra gli Stati Uniti ed il Messico (dal Texas occidentale alla California), in America Centrale e Meridionale. Non è presente in Europa. L'*habitat* del fungo è rappresentato dal terreno, specialmente quello alcalino, in particolare di zone aride o desertiche (Lower Sonoran Life Zone): questo ambiente è caratterizzato da rare piogge, che consentono lo sviluppo della forma miceliale, seguite da lunghi periodi di siccità. Durante i periodi umidi si formano migliaia di artroconidi (spore) separati tra loro da una cellula vuota, che va incontro a morte durante i periodi secchi, consentendo agli artroconidi di disperdersi nell'aria.

Coccidioidomicosi

- L'infezione nell'uomo è generalmente conseguente all'inalazione di artroconidi presenti nell'aria o nella polvere; sono segnalati casi d'infezione per via percutanea.
- *Coccidioides immitis* rappresenta uno dei miceti più pericolosi da maneggiare in laboratorio: sono infatti descritti alcuni casi di infezioni contratte da personale di laboratorio in seguito alla manipolazione errata delle colture.

Coccidioidomicosi

Le epidemie avvengono dopo uragani o tempeste che disperdono gli artroconidi. La coccidioidomicosi è acquisita per inalazione delle spore (artroconidi). Raggiunti i polmoni gli artroconidi si trasformano in forme sferiche dette "sferule". Dopo 7-21 gg si manifesta un'affezione polmonare acuta che si risolve generalmente in pochi giorni. L'infezione comunque può cronicizzare o disseminare alle meningi, ossa, articolazioni e tessuto cutaneo e sottocutaneo. Circa il 25% dei pazienti con malattia disseminata presenta meningite

Sferule

Coccidioidomicosi- diagnosi

Campioni: Escreato, tessuto

1. **esame Diretto** (KOH; H&E)
   Sferule
2. **Coltura**
   SDA: Colonie filamentose a 25 °C
   Sferule in vitro con incubazione in terreni ricchi 40°C, 20% CO_2

Coccidioidomicosi- diagnosi

3. **Sierologia**

Precipitine (IgM)

Fissazione del Complemento

test cutaneo (coccidioidina e antigene sferulina) Un risultato negativo esclude la diagnosi

Coccidioidomicosi- diagnosi

- **Aspetti macroscopici**: a 25°C il micete manifesta una crescita moderatamente lenta (10-12 giorni). Su Sabouraud Dextrose Agar le colonie, inizialmente umide, glabre, grigiastre, tendono rapidamente a diventare cotonose o vellutate, di colore bianco, con tendenza al grigio-bruno con l'invecchiamento. Il *verso* della colonia è grigiastro. Il grado di crescita e l'aspetto presentano notevole variabilità. Lo sviluppo è inibito da cicloeximide. Mentre a 35-37°C viene mantenuto l'aspetto filamentoso, a 37-40°C, su particolari substrati e a livello tissutale, può produrre sferule rotondeggianti.

Coccidioidomicosi- diagnosi

- **Aspetti microscopici**: a 25°C si osserva la presenza di ife ramificate, settate, che producono artroconidi rettangolari, a botte, a parete spessa (2-4 x 3-6 mm) che comportano la diagnosi differenziale con *Geotrichum* spp. Caratteristica di queste specie è l'alternanza di artroconidi a parete spessa, più scuri, con cellule a parete sottile, più chiare (*disjunctor cells*). Gli artroconidi vengono liberati per frammentazione del micelio. A 37-40°C o a livello tissutale, presenza di sferule (15-80 mm), larghe, rotondeggianti, a parete spessa, che contengono endospore (2-5 mm).

- La determinazione di **esoantigeni** mediante *test* di immunodiffusione è il metodo di scelta per la conferma diagnostica